脱氧雪腐镰刀菌烯醇暴露对仔猪海马神经细胞神经递质、脂质过氧化及钙稳态的影响*

王希春　储小燕　张娅菲　朱　雷　范梦雪　冯士彬　李　玉　吴金节

（安徽农业大学动物科技学院，合肥 230036）

摘　要：本试验旨在研究脱氧雪腐镰刀菌烯醇（deoxynivalenol，DON）暴露对体外培养的仔猪海马神经细胞中神经递质、脂质过氧化及钙稳态的影响，探讨 DON 的神经毒性作用。以不同质量浓度的 DON（0、125、250、500、1 000 和 2 000 ng/mL）处理仔猪海马神经细胞 24 h 后，检测细胞中 5–羟色胺（5-HT）、多巴胺（DA）、乙酰胆碱（ACH）、γ-氨基丁酸（GABA）、去甲肾上腺素（NE）含量，总抗氧化能力（T-AOC）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）活性和一氧化氮（NO）、丙二醛（MDA）含量，钙离子（Ca^{2+}）、钙调蛋白（CaM）含量以及 *CaM* mRNA 相对表达量。结果表明：与对照组相比，1）当 DON 浓度为 1 000 ng/mL 时，5-HT、DA、ACH 含量显著升高（$P<0.05$），GABA 含量极显著升高（$P<0.01$），而 NE 含量显著降低（$P<0.05$）；当 DON 浓度为 2 000 ng/mL 时，5-HT、DA、ACH 含量极显著升高（$P<0.01$）。2）当 DON 浓度为 250 ng/mL 时，SOD 活性和 T-AOC 极显著降低（$P<0.01$）；当 DON 浓度为 1 000 ng/mL 时，GSH-Px 活性显著降低（$P<0.05$），NO 含量极显著降低（$P<0.01$），而 MDA 含量极显著升高（$P<0.01$）；当 DON 浓度为 2 000 ng/mL 时，CAT 活性显著降低（$P<0.05$），GSH-Px 活性极显著降低（$P<0.01$）。3）当 DON 浓度为 125 ng/mL 时，CaM 含量极显著升高（$P<0.01$）；当 DON 浓度为 250 ng/mL 及以上时，Ca^{2+}含量和 *CAM* mRNA 相对表达量极显著升高（$P<0.01$）。综上，DON 暴露可改变仔猪海马神经细胞神经递质的分泌及脂质过氧化，并影响钙稳态，对仔猪海马神经细胞具有一定的神经毒性作用。

关键词：脱氧雪腐镰刀菌烯醇；仔猪海马神经细胞；神经递质；脂质过氧化；钙稳态

中图分类号：S816　　　　　　　　文献标识码：　　　　　　　　　文章编号：

脱氧雪腐镰刀菌烯醇（deoxynivalenol，DON），又称为呕吐毒素，是由多种镰刀菌侵染小麦和玉米等谷类作物产生的一种有毒次级代谢产物，由于其在食物链中具有高水平暴露和高污染频率特性而受到极大关注[1-2]。DON 作为谷物中检出率和检出量最高的霉菌毒素，对人类和动物的健康构成了严重威胁[3]。通过研究 DON 对动物流行病学的影响，食品科学

收稿日期：2018-03-13

基金项目：国家自然科学基金项目（31472250）；安徽省生猪产业技术体系资助项目（AHCYJSTX-05）

作者简介：王希春(1978—)，男，安徽利辛人，副教授，博士，从事畜禽营养代谢病与中毒病研究。E-mail: wangxichun@ahau.edu.cn

委员会（SCF）在 2002 年已经设定了 DON 的每日可接受摄入量（TDI）为 1.0 μg/kg[4]。研究表明，DON 对动物的毒性作用主要体现在损害免疫系统、胃肠道和大脑的健康[5]。当猪摄入 DON 后，表现为采食量下降，体重增加缓慢，摄入的 DON 至少有 67%被吸收，表明猪对 DON 有高度敏感性[6]。Lessard 等[7]给仔猪饲喂 DON 污染饲粮，发现回肠中主要抗氧化剂谷胱甘肽过氧化物酶 2（*GPx*-2）基因表达上调，而编码酶的抗氧化剂谷胱甘肽过氧化物酶 3（*GPx*-3）、超氧化物歧化酶 3（*SOD*-3）基因表达下调，表明 DON 对仔猪肠道免疫系统具有一定的毒性作用。尽管有人认为成年家畜对 DON 具有一定的耐受性，但 DON 对仔猪的毒害作用尤其是对神经系统的损伤却不容忽视。Gaigé等[8]试验证明，脑是 DON 的敏感区域，也是激活神经元的区域，下丘脑和脑干能调节 DON 引起的反应。耿芳芳等[9]研究报道，DON 可影响雏鸡脑组织中神经递质 5–羟色胺（5-HT）、去甲肾上腺素（NE）和多巴胺（DA）的分泌，同时改变神经细胞中钙离子（Ca^{2+}）和组织中钙调蛋白（CaM）含量及组织中 *CaM* mRNA 相对表达量，表明 DON 体内暴露可对雏鸡产生一定的神经毒性。

研究发现，DON 对胃肠道黏膜细胞和淋巴细胞等均具有一定的损伤作用[1,10]。目前 DON 对动物体内和体外毒性作用的研究较多，而关于 DON 对神经细胞毒性作用的体外研究尚未见报道。由于猪是对 DON 最敏感的试验动物，而海马神经细胞是中枢神经系统中最容易受外界因素影响而受损的区域，因此，本试验以仔猪海马神经细胞（piglet hippocampal nerve cells，PHNCs）为对象，研究 DON 染毒后对细胞中神经递质、脂质过氧化及钙稳态的影响，以探讨 DON 诱导的仔猪海马神经细胞毒性作用，为进一步阐明 DON 的毒性机理提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

仔猪海马神经细胞购自赛齐生物有限公司；DON 标准品（浓度大于 99%）购自美国 Sigma 公司；DMEM 高糖培养基购自美国 HyClone 有限公司；胎牛血清、二甲基亚砜购自美国 Clark 有限公司；胰酶细胞消化液购自碧云天生物技术公司；5-HT、DA、乙酰胆碱（ACH）、γ-氨基丁酸（GABA）、NE、总抗氧化能力（T-AOC）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、一氧化氮（NO）、丙二醛（MDA）试剂盒均购自上海源叶生物科技有限公司；Ca^{2+}、CaM 试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司。

CO_2 恒温培养箱购自美国 Thermo 公司；微量移液器购自美国 Eppendorf 公司；Multiskan Mk3 型酶标仪购自上海赛默飞世尔仪器有限公司；TGL-18R 台式高速离心机购自珠海黑马医学仪器有限公司；超净工作台购自苏州智净净化设备有限公司；JY92-Ⅱ超声波细胞粉碎

机购自宁波新芝科器研究所；Arktik 多功能 PCR 仪购自美国 Thermo 公司。

1.2 仔猪海马神经细胞的培养和分组

将 1 mg DON 用无菌水配制成 1 mg/mL DON 基础工作液，将其加入到 DMEM 高糖培养基中，配制 DON 质量浓度分别为 0、125、250、500、1 000 和 2 000 ng/mL 的工作液。于 25 cm^2 正方细胞培养瓶内用 DMEM 高糖培养基（添加体积分数 10%的胎牛血清和适量抗生素）培养仔猪海马神经细胞，培养条件为 37 ℃、体积分数为 5% CO_2。将生长状态良好的仔猪海马神经细胞用 DMEM 高糖培养基调节至细胞密度为 5×10^5 个/mL，接种于 6 孔板内连续培养 24 h，然后再用配制好的不同质量浓度的 DON 处理细胞 24 h 后，收集处理后的细胞用于神经递质、脂质过氧化及钙稳态指标的检测。

1.3 神经递质、脂质过氧化指标的检测

仔猪海马神经细胞染毒培养 24 h 后，收集细胞，1 000 r/min 离心 5 min，用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次。之后向每个样品中加入 500 μL 含 0.1% Triton X-100 的 0.1 mol/L Tris-HCl（pH=7.4），在冰水浴中进行超声裂解。将细胞裂解液以 1 000 r/min 离心 l0 min，收取上清液，按照试剂盒说明书中操作步骤进行测定，用酶标仪读取波长 450 nm 的吸光度（OD）值，利用测得的标准曲线计算细胞中神经递质 5-HT、DA、ACH、GABA、NE 含量，脂质过氧化指标 CAT、GSH-Px、SOD 活性、T-AOC 及 NO、MDA 含量。

1.4 钙稳态相关指标的检测

1.4.1 细胞中 Ca^{2+}、CaM 含量检测

仔猪海马神经细胞染毒培养 24 h 后，收集细胞，1 000 r/min 离心 5 min，用 PBS 洗涤并悬浮细胞，在冰水浴中进行超声裂解。将裂解后的细胞悬液以 3 000 r/min 离心 3 min，收取上清液，部分保存于-20 ℃冰箱，部分进行蛋白浓度测定，之后按照 Ca^{2+}检测试剂盒（甲基麝香草酚蓝微板法）和猪 CaM 检测试剂盒（酶联免疫吸附测定法）说明书中操作步骤进行测定，用酶标仪读取波长 450 nm 的 OD 值，计算细胞中 Ca^{2+}和 CaM 含量。

1.4.2 细胞中 *CaM* mRNA 表达量检测

将接种于 6 孔细胞培养板的仔猪海马神经细胞经不同质量浓度的 DON 染毒处理 24 h 后，吸弃培养板中的液体，向每孔中加入 1 mL Trizol 裂解液，用无 RNase 枪头反复吹打，提取 RNA；RNA 使用 StarScript Ⅱ First-strand cDNA Synthesis Mix 在 42 ℃反转录 30 min，85 ℃ 5 min 使反转录酶失活，获得所需 cDNA。

根据 GenBank 中发布的猪 *CaM*（NM_001244209.1）和 18s RNA（NR_046261.1）全基因序列，运用 Prime 5.0 软件设计特异性上、下游引物，并利用 GenBank BLAST 进行同源

性检索，之后由通用生物系统（安徽）有限公司合成。引物序列及参数见表 1。

表 1　*CaM* 目的基因和 18s RNA 内参基因引物参数

Table 1　Primer parameters of *CaM* target gene and 18s RNA reference gene

基因 Genes	登录号 Accession No.	引物序列 Primer sequences (5′—3′)	产物大小 Product size/bp
18s RNA	NR_046261.1	Forward: CGGCGACGACCCATTCGAAC Reverse: GAATCGAACCCTGATTCCCCGTC	99
钙调蛋白 *CaM*	NM_001244209.1	Forward: TGAAGGATACAGACAGCGAG Reverse: GATGTCAGCCTCTCTGATCA	164

参照 StepOne^{TM} Real-time PCR System 和 BIOMIGA SYBR qPCR Mix 配制 PCR 反应体系，然后按以下程序进行 PCR 扩增：95 ℃预变性 2 min；95 ℃ 10 s，56 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，40 个循环；72 ℃延伸 5 min。熔解曲线 95 ℃ 1 min，55 ℃ 1 min，每 10 s 0.5 ℃的速度由 55 ℃升温至 98 ℃。试验组的目的基因 *CaM* 和内参基因 18s RNA 均在同一参数下进行 3 个重复试验。以无 DON 处理的仔猪海马神经细胞为内参（设定其表达水平为 1），采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算试验组仔猪海马神经细胞 *CaM* mRNA 相对表达量，其中△△Ct 的计算公式为:$\Delta\Delta Ct=(Ct_{试验组\ CAM\ 基因}-Ct_{试验组\ 18s\ RNA\ 基因})-(Ct_{对照组\ CAM\ 基因}-Ct_{对照组\ 18s\ RNA\ 基因})$。

1.5　数据处理

试验数据均以平均值±标准差表示，采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析（one-way ANOVA，LSD），P<0.05 为差异显著，P<0.01 为差异极显著。运用 GraphPad Prism 5.0 数据软件进行柱状图的绘制。

2　结　果

2.1　DON 对仔猪海马神经细胞中神经递质的影响

不同浓度 DON 对仔猪海马神经细胞中神经递质的影响见表 2。由表可知，随 DON 浓度的增加，5-HT、DA、ACH、GABA 含量均呈升高趋势，而 NE 含量呈降低趋势。与对照组相比，当 DON 浓度为 1 000 ng/mL 时，5-HT、DA、ACH 含量显著升高（P<0.05），GABA 含量极显著升高（P<0.01），而 NE 含量显著降低（P<0.05）；当 DON 浓度为 2 000 ng/mL 时，5-HT、DA、ACH 含量极显著升高（P<0.01）。

表 2　DON 对仔猪海马神经细胞中神经递质的影响

Table 2　Effects of DON on neurotransmitters in PHNCs

DON 浓度 DON Concentration/（ng/mL）	5–羟色胺 5-HT/（ng/mL）	多巴胺 DA/（pg/mL）	乙酰胆碱 ACH/（μg/mL）	γ–氨基丁酸 GABA/（μmol/L）	去甲肾上腺素 NE/（ng/mL）
0	34.92±2.59	41.49±2.12	37.06±1.73	30.46±1.29	52.95±1.13
125	37.07±0.29	44.93±5.69	38.35±1.71	32.79±2.05	49.39±1.64
250	37.67±0.46	49.34±5.98	38.70±2.68	35.50±1.55	49.55±0.66
500	37.72±2.24	51.42±4.85*	38.72±1.01	38.86±1.28*	49.51±3.54
1 000	39.29±1.41*	53.75±5.46*	41.74±1.09*	42.01±4.49**	46.52±2.59*
2 000	42.33±3.00**	59.63±3.64**	46.68±1.84**	47.82±7.08**	46.98±2.19*

同列数据无肩标表示与对照组相比差异不显著(P>0.05)，*表示与对照组相比差异显著（P<0.05），**表示与对照组相比差异极显著（P<0.01），下表同。

In the same column, values with no superscripts mean no significant difference compared with control group (P>0.05), while with * mean significant difference compared with control group (P<0.05), and with ** mean significant difference compared with control group (P<0.01). The same as below.

2.2 DON 对仔猪海马神经细胞中脂质过氧化指标的影响

不同浓度 DON 对仔猪海马神经细胞中脂质过氧化指标的影响见表 3。由表可知，随 DON 浓度的增加，CAT、GSH-Px、SOD 活性，T-AOC 和 NO 含量呈降低趋势，而 MDA 含量呈升高趋势。与对照组相比，当 DON 浓度为 250 ng/mL 时，SOD 活性和 T-AOC 极显著降低（P<0.01）；当 DON 浓度为 1 000 ng/mL 时，GSH-Px 活性显著降低（P<0.05），NO 含量极显著降低（P<0.01），而 MDA 含量极显著升高（P<0.01）；当 DON 浓度为 2 000 ng/mL 时，CAT 活性显著降低（P<0.05），GSH-Px 活性极显著降低（P<0.01）。

表 3 DON 对仔猪海马神经细胞脂质过氧化指标的影响

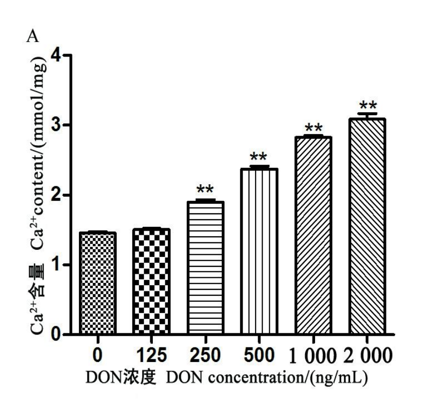
Table 3 Effects of DON on lipid peroxidation indexes in PHNCs

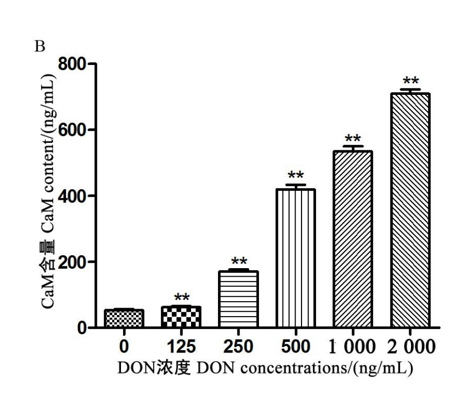
DON 浓度 DON Concentration/（ng/mL）	过氧化氢酶 CAT/(U/mL)	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px/(U/mL)	超氧化物歧化酶 SOD/(U/mL)	总抗氧化能力 T-AOC/(U/mL)	一氧化氮 NO/(μmol/L)	丙二醛 MDA/(nmol/mL)
0	38.33±1.44	39.36±2.95	44.08±0.71	62.29±6.35	49.23±3.33	41.33±6.12
125	36.03±2.82	38.92±2.47	40.79±1.42*	54.36±6.11*	44.15±2.74	41.88±6.92

250	34.45±3.83	37.97±1.84	39.88±1.93**	51.55±4.05**	44.27±7.20	46.05±3.85
500	33.84±1.49	35.09±1.09	38.86±1.28**	42.40±4.90**	38.39±3.37**	47.58±3.67
1 000	32.20±3.28	33.56±2.61*	36.78±1.26**	40.21±4.92**	38.59±2.61**	55.99±7.57**
2 000	31.16±4.28*	30.88±4.84**	37.72±0.67**	42.33±0.38**	36.85±0.86**	58.10±4.02**

2.3　DON 对仔猪海马神经细胞中 Ca^{2+}和 CaM 含量的影响

不同浓度 DON 对仔猪海马神经细胞中 Ca^{2+}和 CaM 含量的影响见图 1。由图可知，随 DON 浓度的增加，Ca^{2+}和 CaM 含量呈升高趋势。与对照组相比，当 DON 浓度为 125 ng/mL 时，Ca^{2+}含量有升高趋势（P>0.05），CaM 含量极显著升高（P<0.01）；当 DON 浓度为 250 ng/mL 及以上时，Ca^{2+}含量极显著升高（P<0.01）。





A：DON 对仔猪海马神经细胞中 Ca^{2+}含量的影响；B：DON 对仔猪海马神经细胞中 CaM 含量的影响。数据柱标注*表示与对照组相比差异显著（P<0.05），**表示与对照组相比差异极显著（P<0.01）。下图同。

A: Effects of DON on the content of Ca^{2+} in PHNCs; B: Effects of DON on the content of CaM in PHNCs. Data column with * mean significant difference compared with control group (P<0.05), and with ** mean significant difference compared with control group (P<0.01). The same as below.

图 1　DON 对仔猪海马神经细胞中 Ca^{2+}和 CaM 含量的影响

Fig.1　Effects of DON on the contents of Ca^{2+} and CaM in PHNCs

2.4　DON 对仔猪海马神经细胞中 *CAM* mRNA 相对表达量的影响

不同浓度 DON 对仔猪海马神经细胞中 *CAM* mRNA 相对表达量的影响见图 2。由图可知，与对照组相比，当 DON 浓度为 125 ng/mL 时，*CAM* mRNA 相对表达量无显著差异（P>0.05）；当 DON 浓度为 250 ng/mL 及以上时，*CAM* mRNA 相对表达量极显著升高（P<0.01），说明 DON 浓度的增加会促进细胞中 *CAM* mRNA 的表达。

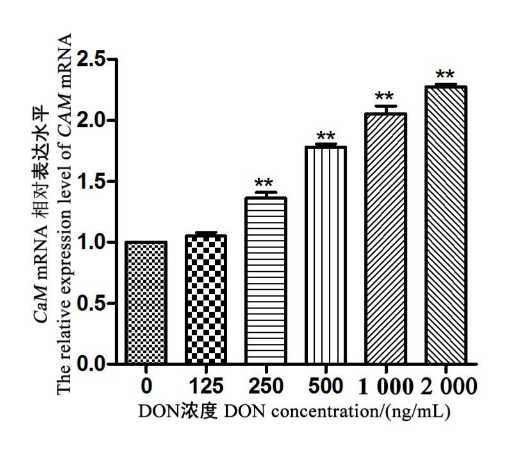


图 2　DON 对仔猪海马神经细胞中 *CAM* mRNA 相对表达量的影响

Fig.2　Effects of DON on the relative expression level of *CAM* mRNA in PHNCs

3　讨　论

DON 是一种 B 型单端孢霉烯族类毒素，主要由镰刀菌次生代谢产生，广泛污染植物源性产物，如农产品和饲料[11-12]。研究证明，DON 对原核细胞和真核细胞都有显著的毒性作用[13-14]。国内外已有很多关于 DON 对动物脑、胃肠道、生殖系统以及免疫系统的研究，而对猪神经细胞毒性作用的研究仍不深入，本试验选用仔猪海马神经细胞作为研究对象，来探讨 DON 染毒后对神经细胞中神经递质、脂质过氧化及钙稳态相关指标的影响。

研究发现，DON 能够通过血脑屏障到达脑部，通过刺激脑部不同区域导致脑组织异常。较低慢性剂量 DON 会引起猪厌食，较高急性剂量 DON 会引起猪呕吐[15]。DON 能影响大脑神经递质的分泌，研究表明，位于脑和胃肠道中的神经递质 5-HT 可能参与调节 DON 诱导的某些效应[16]。Swamy 等[17-18]研究报道，DON 会引起断奶仔猪脑桥 NE 含量降低，下丘脑和脑桥 5–羟吲哚乙酸（5-HIAA）含量升高；脑部 5-HT 含量升高，与 NE 含量呈相反趋势。本试验研究结果表明，不同浓度 DON 对仔猪海马神经细胞攻毒 24 h 后，细胞中 5-HT、DA、ACH、GABA 含量随 DON 浓度的增加呈升高趋势，而 NE 含量呈降低趋势，这与以上报道相一致。

抗氧化系统在动物机体中占很重要的地位[19]。已有研究证明，对小鼠进行 DON 攻毒，发现 DON 会降低小鼠脑抗氧化系统活性，并遭受氧化应激[20]。Kanbur 等[21]研究表明，联合使用玉米赤霉烯酮（ZEA）和 DON，可使小鼠产生自由基，并影响机体的抗氧化功能。Ren 等[22]对小鼠进行 DON 攻毒，发现攻毒组的脑组织 MDA 含量升高，脑组织 SOD、GSH-Px 活性降低，表明小鼠脑功能受 DON 的影响。耿芳芳等[23]对雏鸡进行 DON 攻毒，发现脑组织 CAT、SOD、GSH-Px 活性，T-AOC 及 NO 含量显著降低，而 MDA 含量显著升高。本试

验研究证明，DON 暴露降低仔猪海马神经细胞 CAT、GSH-Px、SOD 活性，T-AOC 和 NO 含量，升高 MDA 含量，这与上述研究结果相符。

钙稳态是指机体正常代谢过程中细胞内游离 Ca^{2+}浓度与细胞外 Ca^{2+}浓度之间较恒定的梯度差，是维持细胞完整性和功能的主要因素[24]。神经细胞内异常增加的 Ca^{2+}作为第二信使，通过多途径钙信号转导，引起涉及蛋白质修饰的短时程反应和改变基因表达的长时程适应性反应[25]。胞质内 Ca^{2+}最主要的结合蛋白是 CaM。Ca^{2+}-CaM 复合物可以调节钙调素依赖性蛋白激酶、蛋白磷酸酶、腺苷酸环化酶、一氧化氮合酶等酶的活性，进而改变突触蛋白的活性，或通过信号转导机制激活相应的基因表达，参与多种细胞内信号反应等病理过程[26-27]。任志华等[28]研究表明，DON 暴露能够增加鸡脾脏淋巴细胞中 Ca^{2+}含量和 *CaM* mRNA 表达量，且均显著或极显著高于对照组，表明 DON 能引起鸡淋巴细胞中钙稳态失衡，这与本试验结果是一致的，表明 DON 能够刺激仔猪海马神经细胞，引起钙稳态失衡。

4 结 论

综上所述，通过体外暴露试验表明，DON 可促进仔猪海马神经细胞中神经递质 5-HT、DA、ACH 和 GABA 的分泌，抑制 NE 的分泌；升高细胞脂质过氧化指标 MDA 含量，降低 CAT、GSH-Px、SOD 活性，T-AOC 和 NO 含量；同时增加神经细胞中 Ca^{2+}和 CAM 含量以及 *CAM* mRNA 基因相对表达量，并呈剂量依赖关系，表明 DON 暴露可对仔猪海马神经细胞产生一定的神经毒性。

参考文献:

[1] HAN J,WANG Q C,ZHU C C,et al.Deoxynivalenol exposure induces autophagy/apoptosis and epigenetic modification changes during porcine oocyte maturation[J].Toxicology and Applied Pharmacology,2016,300:70–76.

[2] SAVARD C,NOGUES P,BOYER A,et al.Prevention of deoxynivalenol- and zearalenone-associated oxidative stress does not restore MA-10 Leydig cell functions[J].Toxicology,2016,341–343:17–27.

[3] TIAN Y,TAN Y L,LIU N,et al.Functional agents to biologically control deoxynivalenol contamination in cereal grains[J].Frontiers in Microbiology,2016,7:395.

[4] LIU Y P,LU Y,WANG L Y,et al.Occurrence of deoxynivalenol in wheat,Hebei province, China[J].Food Chemistry,2016,197:1271–1274.

[5] LI W,LI J ,LI Y H,et al.Aflatoxin B_1,zearalenone and deoxynivalenol in feed ingredients and complete feed from different province in China[J].Journal of Animal Science and

Biotechnology,2017,7:63.

[6] PARK S H,KIM J,KIM D,et al.Mycotoxin detoxifiers attenuate deoxynivalenol-induced pro-inflammatory barrier insult in porcine enterocytes as an *in vitro* evaluation model of feed mycotoxin reduction[J].Toxicology in Vitro,2016,38:108–116.

[7] LESSARD M,SAVARD C,DESCHENE K,et al.Impact of deoxynivalenol (DON) contaminated feed on intestinal integrity and immune response in swine[J].Food and Chemical Toxicology,2015,80:7–16.

[8] GAIGÉ S,BONNET M S,TARDIVEL C,et al.c-Fos immunoreactivity in the pig brain following deoxynivalenol intoxication:focus on NUCB2/nesfatin-1 expressing neurons[J]. NeuroToxicology,2013,34(1):135–149.

[9] 耿芳芳,范梦雪,姜云晶,等.DON 暴露对雏鸡神经递质及钙调蛋白含量的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2017,45(2):56–62.

[10] KATIKA M R,HENDRIKSEN P J,SHAO J,et al.Transcriptome analysis of the human T lymphocyte cell line Jurkat and human peripheral blood mononuclear cells exposed to deoxynivalenol (DON):New mechanistic insights[J].Toxicology & Applied Pharmacology, 2012,264(1):51–64.

[11] BROEKAERT N,DEVREESE M,DEMEYERE K,et al.Comparative *in vitro* cytotoxicity of modified deoxynivalenol on porcine intestinal epithelial cells[J].Food and Chemical Toxicology,2016,95:103–109.

[12] FENG C,MA Y L,XUE C Y,et al.The combination of deoxynivalenol and zearalenone at permitted feed concentrations causes serious physiological effects in young pigs[J].Journal of Veterinary Science,2008,9(1):39–44.

[13] BENSASSI F,GALLERNE C,EL DEIN O S,et al.Involvement of mitochondria-mediated apoptosis in deoxynivalenol cytotoxicity[J].Food and Chemical Toxicology, 2012,50(5): 1680-1689.

[14] 范梦雪,陈晓芳,姜云晶,等.脱氧雪腐镰刀菌烯醇对仔猪海马神经细胞的毒性作用[J].中国兽医科学,2017,47(1):121–127.

[15] SAVARD C,PINILLA V,PROVOST C,et al.*In vitro* effect of deoxynivalenol (DON) mycotoxin on porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication[J].Food and Chemical Toxicology,2014,65:219–226.

[16] ENYEDY E J,MITCHELL J P,NAMBIAR M P,et al.Defective FcγRIIb1 signaling contributes to enhanced calcium response in B cells from patients with systemic lupus erythematosus[J].Clinical Immunology,2001,101(2):130–135.

[17] SWAMY H V L N,SMITH T K,MACDONALD E J,et al.Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium mycotoxins* on swine performance,brain regional neurochemistry,and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent[J].Journal of Animal Science,2002,80(12):3257–3267.

[18] SWAMY H V,SMITH T K,MACDONALD E J.Effects of feeding a blend of grains naturally ontaminated with *Fusarium mycotoxins* on brain regional neurochemistry of starter pigs and broiler chickens[J].Journal of Animal Science,2004,82(7):2131–2139.

[19] REN Z H,WANG Y C,DENG H D,et al.Deoxynivalenol induces apoptosis in chicken splenic lymphocytes via the reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway[J].Environmental Toxicology and Pharmacology,2015,39(1):339–346.

[20] LIANG Z,REN Z H,GAO S,et al.Individual and combined effects of deoxynivalenol and zearalenone on mouse kidney[J].Environmental Toxicology and Pharmacology, 2015, 40(3): 686–691.

[21] KANBUR M,ERASLAN G,SARICA Z S,et al.The effects of evening primrose oil on lipid peroxidation induced by subacute aflatoxin exposure in mice[J].Food and Chemical Toxicology,2011,49(9):1960–1964.

[22] REN Z H,DENG H D,DENG Y T,et al.Effect of the *Fusarium* toxins,zearalenone and deoxynivalenol,on the mouse brain[J].Environmental Toxicology and Pharmacology, 2016, 46:62–70.

[23] 耿芳芳,许伟,范梦雪,等.脱氧雪腐镰刀菌烯醇对雏鸡脂质过氧化反应及脑部形态结构的影响[J].南京农业大学学报,2016,39(3):460–466.

[24] PLANK M J,WALL D J N,DAVID T.Atherosclerosis and calcium signalling in endothelial cells[J].Progress in Biophysics and Molecular Biology,2006,91(3):287–313.

[25] GUTHRIE H D,WELCH G R,THEISEN D D,et al.Effects of hypothermic storage on intracellular calcium,reactive oxygen species formation,mitochondrial function,motility,and plasma membrane integrity in striped bass (*Morone saxatilis*) sperm[J]. Theriogenology, 2011, 75(5):951–961.

[26] 刘冰,金一和.中枢神经系统钙稳态紊乱与神经损伤的研究进展[J].环境卫生学杂志,2006,33(4):193–198.

[27] JIMENEZ-GONZALEZ C,MICHELANGELI F,HARPER C V,et al.Calcium signalling in human spermatozoa:a specialized ‘toolkit’ of channels,transporters and stores[J].Human Reproduction Update,2006,12(3):253–267.

[28] 任志华,王亚超,邓俊良.脱氧雪腐镰刀菌烯醇与玉米赤霉烯酮联合暴露对体外培养鸡脾脏淋巴细胞内环境稳态的影响[J].动物营养学报,2017,29(8):2836–2842.

Effects of Deoxynivalenol Exposure on Neurotransmitter, Lipid Peroxidation and Calcium Homeostasis in Piglet Hippocampal Nerve Cells*

WANG Xichun CHU Xiaoyan ZHANG Yafei ZHU Lei FAN Mengxue FENG Shibing LI Yu WU Jinjie

(*College of Animal Science and Technology*, *Anhui Agricultural University*, *Hefei* 230036, *China*)

Abstract: This experiment was conducted to investigate the effects of deoxynivalenol (DON) exposure on neurotransmitters, lipid peroxidation and calcium homeostasis in piglet hippocampal nerve cells (PHNCs) cultured *in vitro*, to discuss the neurotoxic effects of DON. PHNCs were exposed to DON at different mass concentrations (0, 125, 250, 500, 1 000, 2 000 ng/mL) for 24 h, and the contents of 5-hydroxytryptamine (5-HT), dopamine (DA), acetylcholine (ACH), γ-aminobutyric acid (GABA) and noradrenaline (NE), total antioxidant capacity (T-AOC), the activities of glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), the contents of nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA), the contents of Ca^{2+} and calmodulin (CAM) and the relative expression of *CaM* mRNA in cells were determined. The results showed as follows: compared with control group, 1) when the concentration of DON was 1 000 ng/mL, the contents of 5-HT, DA and ACH were significantly increased (P<0.05), the content of GABA was significantly increased (P<0.01), while the content of NE was significantly decreased (P<0.05). When the concentration of DON was 2 000 ng/mL, the contents of 5-HT, DA and ACH were significantly increased (P<0.01). 2) When the concentration of DON was 250 ng/mL, the activities of SOD and T-AOC were significantly decreased (P<0.01). When the concentration of DON was 1 000 ng/mL, the activity of GSH-Px was significantly decreased (P<0.05), and the

*Author, WANG Xichun, associate professor, E-mail: wangxichun@ahau.edu.cn （责任编辑 李慧英）

content of NO was significantly decreased ($P<0.01$), while the content of MDA was significantly increased ($P<0.01$). When the concentration of DON was 2 000 ng/mL, the activity of CAT was significantly decreased ($P<0.05$), and the activity of GSH-Px was significantly decreased ($P<0.01$). 3) When the concentration of DON was 250 ng/mL, the content of CaM was significantly increased ($P<0.01$). When the concentration of DON was 250 ng/mL and above, the content of Ca^{2+} and the relative expression level of *CAM* mRNA were significantly increased ($P<0.01$). In conclusion, DON exposure can change the secretions of neurotransmitters, the lipid peroxidation and calcium homeostasis in PHNCs, it suggests that DON has some neurotoxic effects to PHNCs.

Key words: deoxynivalenol; piglet hippocampal nerve cells; neurotransmitter; lipid peroxidation; calcium homeostasis